

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    3 月    6 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 0 6 0 0 5 7  
Application Number:

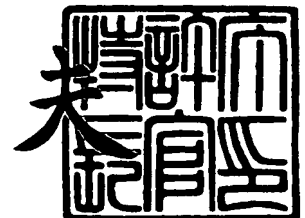
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 0 6 0 0 5 7 ]

出 願 人  
Applicant(s):                      白 澤    卓 二  
   清 水    孝 彦  
   株式会社フィナンシャル・コンサルティング

2 0 0 3 年 1 0 月 1 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 TMI03001P

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 48/00

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都板橋区栄町 3 5 - 2 東京都老人総合研究所内

    【氏名】 白澤 卓二

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都板橋区栄町 3 5 - 2 東京都老人総合研究所内

    【氏名】 清水 孝彦

【特許出願人】

    【識別番号】 501115612

    【氏名又は名称】 白澤 卓二

【特許出願人】

    【住所又は居所】 東京都板橋区栄町 3 5 - 2 東京都老人総合研究所内

    【氏名又は名称】 清水 孝彦

【代理人】

    【識別番号】 100090251

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 森田 憲一

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 017813

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組織低酸素状態の改善剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) タイタスビル型変異を有する  $\alpha$  グロビン；

(2) 前記タイタスビル型  $\alpha$  グロビンのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；又は

(3) 前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター  
を有効成分として含む、組織低酸素状態の改善剤。

【請求項 2】 タイタスビル型変異を有する  $\alpha$  グロビンのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを発現可能に有する、トランスジェニック非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、組織低酸素状態の改善剤に関する。本発明の組織低酸素状態改善剤は、虚血病態、例えば、呼吸不全又は虚血性疾患〔例えば、虚血性心疾患（例えば、心筋梗塞又は狭心症）、脳虚血、又は閉塞性血管障害（例えば、閉塞性動脈硬化）〕の治療又は予防に有用である。

【0002】

【従来の技術】

慢性呼吸不全症では、種々の換気不全により末梢臓器が慢性の低酸素状態に暴露されている。このような虚血病態（すなわち、組織低酸素状態を伴う疾病）としては、呼吸不全症以外にも、種々の虚血性疾患、例えば、虚血性心疾患（例えば、心筋梗塞又は狭心症）、脳虚血、又は閉塞性血管障害（例えば、閉塞性動脈硬化）などが挙げられる。これらの疾病における組織低酸素状態を改善させる方法の1つとして、ヘモグロビンの酸素親和性に着目したアプローチが公知である。

【0003】

ヘモグロ빈は、赤血球中に含まれ、肺から末梢組織への酸素運搬に主要な役

割を果たす、4つのサブユニットからなる四量体のタンパク質である。より具体的には、 $\alpha$ 鎖群 ( $\alpha$  又は  $\zeta$ ) グロビン 2個と非 $\alpha$ 鎖群 ( $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、又は  $\epsilon$ ) グロビン 2個の合計 4個のグロビンに、それぞれ 1個ずつのヘムが結合した四量体を形成する。ヘモグロビンには、1000を超える変異体が知られており (非特許文献 1)、例えば、ヘモグロビンの酸素親和性についても、低酸素親和性を示す変異体及び高酸素親和性を示す変異体が公知である。

ヘモグロビンの酸素親和性は、酸素解離曲線 (例えば、後述の実施例 2 に示す図 2 参照) から把握することができ、例えば、低酸素親和性を示す変異ヘモグロビンでは、正常ヘモグロビンの酸素解離曲線と比較して、右方向への移動 (右方移動) を呈し、高酸素親和性を示す変異ヘモグロビンでは左方向への移動 (左方移動) を呈する。

#### 【0004】

ヘモグロビンの酸素親和性を低下させる (すなわち、ヘモグロビンの酸素解離曲線を右方移動させる) ことにより、組織低酸素状態を改善させる試薬としては、虚血性心疾患の治療薬として開発が行われている、2-[4-[(3,5-二置換アニリノ)カルボニル]メチル]フェノキシ]-2-メチルプロプリオニックアシッド誘導体 (RSR13) を有効成分とする合成アロステリック作用薬が公知である (非特許文献 2)。

#### 【0005】

本発明者らは、前記合成アロステリック作用薬とは異なるアプローチとして、低酸素親和性を示す変異ヘモグロビンの 1つであるプレズビテリアン (Presbyterian) 型変異ヘモグロビンを利用する方法を提案した (非特許文献 3)。プレズビテリアン型変異では、 $\beta$ グロビン遺伝子における第108番目のアスパラギン (Asn) がリジン (Lys) に置換されている。本発明者らは、プレズビテリアン型変異ヘモグロビンが組織へ及ぼす効果をインビボ (in vivo) で検討するために、プレズビテリアン型変異をマウス  $\beta$ グロビン遺伝子に導入したノックインマウスを作製した。

#### 【0006】

前記非特許文献 3 によれば、プレズビテリアン変異ヘテロマウス由来のプレズ

ビテリアン型ヘモグロビン、野生型マウス由来のヘモグロビンと比較して、右方移動を呈した。

また、プレズビテリアン変異ヘテロマウスの前脛骨筋では、野生型マウスと比較して、酸化系酵素の豊富なIIA型線維の増加が認められ、また、酸化系酵素活性の指標であるサクシネートデヒドロゲナーゼ (SDH) 活性の増加も、IIA型線維及びIIB型線維のいずれにおいても認められた。これらの前脛骨筋における変化は、末梢組織において高い酸素代謝能（例えば、酸化系酵素活性の向上）を獲得したことを示しており、更に、呼吸代謝のパラメーターである $O_2$ 消費量及び $CO_2$ 生成量がプレズビテリアン変異ヘテロマウスにおいて増加していることから、酸素分子を末梢組織に効率よく運搬及び供給可能であることが確認された。

更に、自主的走行実験を行ったところ、プレズビテリアン変異ヘテロマウスは、野生型マウスと比較して、一日当たりの平均走行距離で2倍以上の値を示した。この走行実験の結果は、野生型マウスと比較して、酸素分子を末梢組織に効率よく運搬及び供給可能となったことにより、走行中の筋肉組織における組織低酸素状態が改善され、平均走行距離が延びたものと考えられる。なお、プレズビテリアン変異マウスでは、全ヘモグロビンに対するプレズビテリアン型ヘモグロビンの割合が、最大でも30%以下であった。

#### 【0007】

本発明者らは、前記非特許文献3において、ヒトプレズビテリアン症例の生理学的特性についても報告している。ヒトプレズビテリアン症例では、軽度の貧血が認められるものの、低酸素換気応答検査及び二酸化炭素換気応答検査の結果、低酸素又は二酸化炭素の負荷により、健常者と比較して、呼吸数が約半分になることが判明した。この結果は、ヒトプレズビテリアン症例では、酸素分子を末梢組織に効率よく運搬及び供給可能であるため、健常者の約半分の呼吸数でも運動を継続することが可能となったことを示している。

これらのプレズビテリアン変異マウス及びヒトプレズビテリアン症例の解析から、本発明者らは、低酸素親和性を示すプレズビテリアン型変異ヘモグロビンが、酸素分子を末梢組織に効率よく運搬及び供給可能であり、その結果、組織低酸素状態の改善に効果があり、従って、虚血病態の治療又は予防に有効であること

を示した。

【0008】

【非特許文献1】

「ブラッド (Blood)」, (米国), 1998年, 第91巻, p. 2643-2644

【非特許文献2】

「ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (The Journal of Clinical Investigation)」, (米国), 1999年, 第103巻, p. 739-746

【非特許文献3】

玉置正勝、清水孝彦、鈴木陽一、及び白澤卓二, 「呼吸不全治療に関する分子生物学的研究」, 厚生省特定疾患呼吸不全研究班平成13年度研究報告書, 呼吸不全研究班, 2001年, p. 150-154)

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者は、プレズビテリアン型変異ヘモグロビンよりも更に組織低酸素状態の改善効果に優れた変異ヘモグロビンを取得することを目的として鋭意探索したところ、タイタスビル (Titusville) 型変異ヘモグロビンが、より優れた組織低酸素状態の改善効果を示すことを新たに見出した。より具体的には、自主的走行実験において、タイタスビル変異ヘテロマウスは、野生型マウスと比較して、一日当たりの平均走行距離で2.5倍以上（プレズビテリアン変異ヘテロマウスでは2倍以上）の値を示した。しかも、タイタスビル変異マウスでは、全ヘモグロビンに対するタイタスビル型ヘモグロビンの割合が、最大でも15%以下（プレズビテリアン変異マウスでは30%以下）であり、タイタスビル型ヘモグロビンは含有割合が低いにもかかわらず、優れた組織低酸素状態の改善効果を示すことが判明した。本発明は、このような知見に基づくものである。

すなわち、本発明の課題は、優れた組織低酸素状態の改善効果を示す、虚血病態の治療又は予防剤を提供することにある。

【0010】

**【課題を解決するための手段】**

前記課題は、本発明による、

- (1) タイタスビル (Titusville) 型変異を有する  $\alpha$  グロビン；
  - (2) 前記タイタスビル型  $\alpha$  グロビンのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；又は
  - (3) 前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター
- を有効成分として含む、組織低酸素状態の改善剤により解決することができる。

また、本発明は、タイタスビル型変異を有する  $\alpha$  グロビンのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを発現可能に有する、トランスジェニック非ヒト動物に関する。

**【0011】****【発明の実施の形態】****[1] 本発明の医薬**

本発明の組織低酸素状態改善剤（以下、単に、本発明の医薬と称することができる）は、その有効成分として、

- (1) タイタスビル型変異を有する  $\alpha$  グロビン；
- (2) 前記タイタスビル型  $\alpha$  グロビンのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド（以下、改善剤用ポリヌクレオチドと称する）；又は
- (3) 前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター（以下、改善剤用発現ベクターと称する）

を含有し、所望により、薬剤学的又は獣医学的に許容することのできる担体又は希釈剤を更に含有することができる。すなわち、本発明の医薬は、前記有効成分の少なくとも1つを、それ単独で、あるいは、薬剤学的又は獣医学的に許容することのできる通常の担体又は希釈剤と共に、組織低酸素状態の改善を必要とする動物、好ましくは哺乳動物（特にはヒト）に、有効量で投与することができる。

**【0012】**

本発明の医薬において有効成分として用いることのできる「タイタスビル型  $\alpha$  グロビン」は、タイタスビル型変異を少なくとも有し、しかも、低酸素親和性（すなわち、右方移動）を示すヘモグロビンを形成可能である  $\alpha$  グロビンである限



り、特に限定されるものではない。タイタスビル型変異とは、 $\alpha$ グロビンの第94番目のアスパラギン酸 (Asp) がアスパラギン (Asn) に置換されている変異を意味する。なお、本明細書において、前記 $\alpha$ グロビンは、第94番目のアミノ酸がアスパラギン酸であって、しかも、そのアスパラギン酸をアスパラギンに置換することによって低酸素親和性を示すヘモグロビンを形成可能な $\alpha$ グロビンである限り、特に限定されるものではないが、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、又はイルカ、好ましくはヒト又はマウス） $\alpha$ グロビンを挙げることができる。

#### 【0013】

前記タイタスビル型 $\alpha$ グロビンとしては、例えば、ヒト $\alpha$ 1グロビン (GenBank accession number AH002715) の第94番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した変異体、あるいは、マウス $\alpha$ 1グロビン (GenBank accession number V00714) の第94番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した変異体などを挙げることができる。

#### 【0014】

本発明の医薬において有効成分として用いることのできる「改善剤用ポリヌクレオチド」は、前記タイタスビル型 $\alpha$ グロビンのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、タイタスビル型 $\alpha$ グロビンのアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。本明細書における「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAが含まれる。

#### 【0015】

本発明の医薬において有効成分として用いることのできる「改善剤用発現ベクター」は、改善剤用ポリヌクレオチドを含み、しかも、前記改善剤用ポリヌクレオチドでコードされるタイタスビル型 $\alpha$ グロビンが投与対象内で発現可能な形で含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、改善剤用ポリヌクレオチドを遺伝子治療用ベクターに発現可能に挿入した発現ベクターを挙げることができる。

前記遺伝子治療用ベクターとしては、挿入される遺伝子を投与対象内で発現可

能とする各種配列（例えば、プロモーター、RNAのスプライス部位、ポリ阿德ニル化部位、又は転写終結配列など）を含むベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、又はレンチウイルスベクター等を挙げることができる。

#### 【0016】

本発明の医薬の投与方法は、タイタスビル型 $\alpha$ グロビンが投与対象内でヘモグロビンとして機能可能である限り、特に限定されるものではなく、その有効成分に応じて適宜選択することができる。

本発明の医薬が有効成分としてタイタスビル型 $\alpha$ グロビンを含む場合、その投与方法は、タイタスビル型 $\alpha$ グロビンを含むヘモグロビンとして投与対象の血管内に注入可能な投与方法である限り、特に限定されるものではなく、例えば、人工血液として投与することができる。人工血液としては、例えば、（１）赤血球から得られるヘモグロビンを架橋することにより得られる架橋型又は重合型ヘモグロビン、あるいは、（２）リポソームにヘモグロビンをカプセル化したりリポソーム型ヘモグロビンが知られている（Squires, J.E., Science, 295, 1002-1004, 2002; 特開平2001-348341号公報）。適当な宿主、例えば、大腸菌（Looker, D. et al., Nature, 356, 258-260, 1992）又はトランスジェニック動物（O'Donnell, J.K. et al., J. Biol. Chem., 269, 27692-27699, 1994）により、タイタスビル型 $\alpha$ グロビンを含むリコンビナントヘモグロビンを産生し、前記人工血液として、本発明の医薬を投与することができる。

#### 【0017】

タイタスビル型 $\alpha$ グロビンを有効成分として含む本発明の医薬では、前記タイタスビル型 $\alpha$ グロビンを、タイタスビル型 $\alpha$ グロビンを含むヘモグロビンとして含むことが好ましい。この場合、前記ヘモグロビン中に含まれる $\alpha$ 鎖は、全てタイタスビル型 $\alpha$ グロビンであることもできるし、あるいは、その一部のみがタイタスビル型 $\alpha$ グロビンであって、非タイタスビル型 $\alpha$ グロビン（例えば、正常 $\alpha$ グロビン又はタイタスビル以外の変異型 $\alpha$ グロビン）を含むこともできる。

後述の実施例に示すように、全ヘモグロビンに対するタイタスビル型ヘモグロビンの割合が最大でも15%以下であるタイタスビル変異マウス〔実施例2（１）

参照]であっても、野生型マウスと比較して、一日当たりの平均走行距離で2.5倍以上の値を示す[実施例2(5)参照]。従って、ヘモグロビンとしてタイタスビル型 $\alpha$ グロビンを含む本発明の医薬では、ヘモグロビン中に含まれる $\alpha$ 鎖の一部のみがタイタスビル型 $\alpha$ グロビンであっても、組織低酸素状態を十分に改善することができる。

#### 【0018】

本発明の医薬が有効成分として改善剤用ポリヌクレオチド又は改善剤用発現ベクターを含む場合、その投与方法としては、例えば、遺伝子治療における種々の方法を用いることができる。このような方法としては、例えば、(1)自家移植による方法、又は(2)胚性幹細胞(ES細胞)を用いる方法などを挙げることができる。

自家移植による方法では、例えば、投与対象から骨髓細胞を採取し、前記骨髓細胞中の造血幹細胞に改善剤用ポリヌクレオチド又は改善剤用発現ベクターを導入した後、必要に応じて遺伝子導入細胞を体外増幅(ex vivo増幅)させ、最終的に投与対象に戻すことにより、タイタスビル型 $\alpha$ グロビンを含むヘモグロビンを投与対象内で発現させることができる。

また、胚性幹細胞を用いる方法では、例えば、胚性幹細胞に改善剤用ポリヌクレオチド又は改善剤用発現ベクターを導入した後、遺伝子導入細胞を造血幹細胞又は赤芽球に分化させ、最終的に投与対象に戻すことにより、タイタスビル型 $\alpha$ グロビンを含むヘモグロビンを投与対象内で発現させることができる。

#### 【0019】

例えば、Pawliuk, R. et al., Science, 294, 2368-2371, 2001には、ヒト $\beta^A$ グロビン遺伝子の一塩基変異に起因する異常ヘモグロビン(HbS)の形成を伴う鎌状赤血球病(SCD)が、SCDモデルマウスにおいて、遺伝子治療により改善されたことが開示されている。より詳細には、異常ヘモグロビンHbSの重合を抑制可能な $\beta^A$ グロビン変異遺伝子を設計し、それをレンチウイルスベクターに組み込むことにより、遺伝子治療用発現ベクターを構築した。マウス骨髓から得られた造血幹細胞に、ウイルス感染により前記発現ベクターを導入した後、前記細胞をマウスに戻すことにより、10箇月の長期に亘って赤血球系列に変異グロビンを

発現させることができた。

#### 【0020】

本発明の医薬を用いる場合の投与量は、例えば、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、症状の程度、有効成分の種類、又は投与方法などに応じて適宜決定することができる。

#### 【0021】

本発明の医薬の有効成分であるタイタスビル型 $\alpha$ グロビンそれ自体、あるいは、本発明の医薬の有効成分である改善剤用ポリヌクレオチド又は改善剤用発現ベクターによりコードされるタイタスビル型 $\alpha$ グロビンは、投与対象の生体内で、タイタスビル型 $\alpha$ グロビンを含むヘモグロビンとして機能することにより、肺から組織（例えば、筋肉、心臓、神経、又は皮膚）への酸素供給能を向上させることができる。すなわち、組織への酸素の運搬及び供給を効率よく行うことができるため、例えば、組織が低酸素状態となった場合でも、その組織低酸素状態を改善することができ、虚血病態、例えば、呼吸不全又は虚血性疾患などの治療又は予防に有用である。前記虚血性疾患には、例えば、虚血性心疾患（例えば、心筋梗塞又は狭心症）、脳虚血、又は閉塞性血管障害（例えば、閉塞性動脈硬化）などが含まれる。

#### 【0022】

また、本発明の医薬は、投与対象の生体内で、タイタスビル型 $\alpha$ グロビンを含むヘモグロビンとして機能することにより、例えば、

- (1) 組織（例えば、筋肉、心臓、神経、又は皮膚）における酸素代謝能の向上（例えば、酸化系酵素活性の向上）；
- (2) 組織（例えば、筋肉、心臓、神経、又は皮膚）の改変（例えば、有酸素運動に適した筋肉への改変）；又は
- (3) 運動能力の向上〔例えば、走力の向上（例えば、走行距離の延長、又は走行負荷に対する耐性の向上など）〕

などの効果を示し、従って、本発明の医薬は、組織における酸素代謝能の向上剤、組織の改変剤、又は運動能力の向上剤としても使用することができる。また、これらの効果を有するため、本発明の医薬は、例えば、脳血管性痴呆症の治療又

は予防に有用である。

### 【0023】

#### [2] 本発明のトランスジェニック非ヒト動物

本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、タイタスビル型  $\alpha$  グロビンのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを発現可能に有する限り、特に限定されるものではなく、公知の方法（例えば、Shirasawa, T. et al., J. Biol. Chem., 278, 5035-5043, 2003）により作製することができる。

前記非ヒト動物としては、例えば、ヒトを除く哺乳動物（例えば、マウス、ラット、イヌ、ネコ、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、又はイルカ）、鳥類（例えば、ニワトリ又はウズラ）、両生類（例えば、カエル）、又は爬虫類などを挙げることができる。

### 【0024】

本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、タイタスビル型  $\alpha$  グロビンを含むヘモグロビンをも有するため、酸素分子を末梢組織に効率よく運搬及び供給可能であり、タイタスビル型  $\alpha$  グロビンを含まない野生型非ヒト動物と比較して、組織低酸素状態に対して耐性を示す。従って、各種疾病、特に虚血病態に対する治療薬又はその候補化合物の評価に適している。例えば、虚血病態に対する治療薬又はその候補化合物の評価、すなわち、組織低酸素状態の改善作用を評価するためには、予め非ヒト動物を組織低酸素状態とすることが必要である。この場合、野生型非ヒト動物では、生命維持自体が困難な状態に陥る可能性が高いのに対して、本発明のトランスジェニック非ヒト動物では、組織低酸素状態に対して耐性を示すため、前記評価を実施することができる。

### 【0025】

#### 【作用】

タイタスビル型ヘモグロビンが低酸素親和性を示す機序は、プレズビテリアン型ヘモグロビンが低酸素親和性を示す機序と異なっている（Shirasawa, T. et al., J. Biol. Chem., 278, 5035-5043, 2003）。プレズビテリアン型ヘモグロビンでは、グロビン四量体の中心部に配向する  $\beta$  108Asn が Lys に変異することにより、ヘモグロビン中心窩へ  $\text{Cl}^-$  を囲い、脱酸素状態で安定化する。一方、タイタ

スビル型ヘモグロビンでは、 $\alpha 1 \beta 2$ サブユニットの境界面に位置する  $\alpha 94$ Asp がAsnに変異することにより、脱酸素状態で安定化する。

#### 【0026】

##### 【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

##### 【実施例 1】

##### 《タイタスビル型ヘモグロビンを発現する変異マウスの作製》

本実施例では、ヘモグロビン  $\alpha 1$  グロビン遺伝子における第94番目のアスパラギン酸 (Asp) をアスパラギン (Asn) に置換することにより、 $\alpha 1$  グロビン遺伝子にタイタスビル変異を導入したノックインマウスを、以下の手順に従って作製した。

作製方針の概略を図1に示す。図1において、各記号「 $\alpha 1$ 」、「 $\zeta$ 」、「neo<sup>r</sup>」、及び「E」は、それぞれ、 $\alpha 1$  グロビン遺伝子、 $\zeta$  グロビン遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、制限酵素EcoRI認識部位を示し、記号「D94N」及びその直下の記号「\*」は、「\*」で示す位置に、第94番目のアスパラギン酸 (D) をアスパラギン (N) に置換した変異を導入したことを示す。

#### 【0027】

マウス  $\alpha 1$  グロビン遺伝子における372bpの5' フランキング配列 (1~372番のヌクレオチド; GenBank accession number V00714) をプローブとして、マウスゲノムの $\lambda$ ファージ ( $\lambda$ FIXII; Stratagene社) ライブラリー129個をスクリーニングすることによって、前記遺伝子の全エクソンをカバーする2個のオーバーラップクローンを得た。 $\alpha 1$  グロビンの全エクソンを含む1.0kbフラグメントを増幅した後、市販のミュータジェネシスキット (pALTER system; Promega社) を用いて、第94番目のAspに対応するコドンGATを、Asnに対応するコドンAATに改変した。5' 相同フラグメント (6.8kb)、変異導入済み  $\alpha 1$  グロビン遺伝子 (1.0kb)、ネオマイシン耐性遺伝子、及び3' 相同フラグメント (2.2kb) をこの順に配置した構築物を、Shirasawa, T. et al., J. Biol. Chem., 278, 5035-5043, 2003に記載の手順に従って構築し、ベクター pMC1DT-A(B) (オリエンタル酵母

)にクローニングした。

### 【0028】

得られたベクターを制限酵素により線状化し、ES細胞のエレクトロポレーションに使用した。G418耐性ESクローン240個の各ゲノムDNAを制限酵素EcoRIで消化し、図1に示すプローブ(800bp)を用いるサザンブロット分析により、所望の相同組換えが起こったクローンをスクリーニングした。選択したESクローンを用いて、アグリゲーション法(Hum. Reprod., 8, 2180-2184, 1993)によりキメラマウスを作製した。キメラマウスをC57BL/6CrSlcマウス(日本SLC)と交配させた後、図1に示すプライマーp1及びp2を用いるPCR増幅により、生殖細胞系への伝達を確認した。

### 【0029】

比較用として、ヘモグロビン $\beta$ グロビン遺伝子における第108番目のアスパラギン(Asn)をリジン(Lys)に置換することにより、 $\beta$ グロビン遺伝子にプレズビテリアン変異を導入したノックインマウスを、Biochem. Biophys. Res. Commun., 295, 869-876, 2002に記載の手順に従って作製した。

### 【0030】

#### 【実施例2】

#### 《変異マウスの解析》

##### (1) ヘモグロビン構成及び全血球算定

タイタスビル変異マウス及びプレズビテリアン変異マウス末梢血から各ヘモグロビンを調製し、逆相HPLCにより分析した。なお、前記調製及び分析は、Shirasawa, T. et al., J. Biol. Chem., 278, 5035-5043, 2003に記載の手順に従って実施した。タイタスビル変異ホモマウスでは、全ヘモグロビンにおける全 $\alpha$ グロビンに対するタイタスビル型 $\alpha$ グロビンの割合の割合が、最大でも15%以下であり、プレズビテリアン変異ヘテロマウスでは、全ヘモグロビンにおける全 $\beta$ グロビンに対するプレズビテリアン型 $\beta$ グロビンの割合の割合が、最大でも30%以下であった。

また、タイタスビル変異マウス及び野生型マウスにおける全血球算定の結果を表1に示す。表1に示すデータは、平均値 $\pm$ SEMである。表1から明らかなよう

に、タイタスビル変異マウスでは、特に異常は認められなかった。

### 【0031】

《表1》

	野生型マウス	タイタスビル変異マウス
RBC (x 10 <sup>6</sup> /ml)	9.67±0.35	9.99±0.44
Hb (g/dl)	15.2±0.6	14.6±0.4
Ht (%)	56.9±2.1	55.1±1.9
MCV (fl)	59.0±0.7	55.2±0.8
MCH (pg)	16.0±0.0	14.7±0.5
MCHC (g/dl)	27.0±0.0	26.5±0.5
WBC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	3.36±0.18	2.63±0.42
Ret (%)	2.2±0.1	2.8±0.7

### 【0032】

#### (2) 赤血球の酸素解離特性の分析

タイタスビル変異マウス (Titu/Wt)、プレズビテリアン変異マウス (Pres/Wt)、タイタスビル及びプレズビテリアン二重変異マウス (Titu/Wt, Pres/Wt)、並びに野生型マウス (Wt/Wt) からそれぞれ調製した赤血球を用いて、酸素解離特性を分析した。赤血球の酸素解離曲線を図2に示し、赤血球のHillプロット (Hill's plot) を図3に示す。図2及び図3における記号「pO<sub>2</sub>」は酸素分圧を意味する。なお、前記分析は、Hemox analyzer (TCS Products社) を用いて37℃で行った。

### 【0033】

図2に示す酸素解離曲線では、プレズビテリアン型ヘモグロビン (P<sub>50</sub>=43.5mmHg) は、野生型ヘモグロビン (P<sub>50</sub>=47.0mmHg) と比較して、右方移動を呈した。また、タイタスビル型ヘモグロビン (P<sub>50</sub>=66.0mmHg) 並びにタイタスビル及びプレズビテリアン型ヘモグロビン (P<sub>50</sub>=72.0mmHg) は、更に顕著に右方移動を呈した。

Hill係数については、プレズビテリアン型ヘモグロビンでは、野生型ヘモグロ



ビンと比較して顕著な差は認められなかったのに対して、タイタスビル型ヘモグロビン並びにタイタスビル及びプレズビテリアン型ヘモグロビンでは、Hill係数が低下した。タイタスビル型ヘモグロビンにおけるHill係数の低下は、酸素結合型ヘモグロビン四量体としての立体特性の変化をもたらすことを示唆している。

#### 【0034】

#### (3) 血液ガス分析及び代謝分析

変異型ヘモグロビンの酸-塩基バランスへの影響を検討するために、タイタスビル変異マウス、プレズビテリアン変異マウス、及び野生型マウスにおける動脈血液のpH、動脈血液におけるCO<sub>2</sub>分圧 (PaCO<sub>2</sub>)、及び動脈血液におけるO<sub>2</sub>分圧 (PaO<sub>2</sub>) をそれぞれ測定した。なお、前記測定は、Shirasawa, T. et al., J. Biol. Chem., 278, 5035-5043, 2003に記載の手順に従って、血液ガス分析器 (OPTI CCA; AVL Scientific Corporation社) を用いて37℃で行った。タイタスビル変異マウス及び野生型マウスについて、結果を表2に示す。表2に示すデータは、平均値±SEMである。

タイタスビル変異マウスでは、通常大気下 (room air) 又は低酸素症状態 (hypoxia) のいずれにおいても、野生型マウスと同じように、正常なpH、PaCO<sub>2</sub>、及びPaO<sub>2</sub>を示した。一方、プレズビテリアン変異マウスでは、通常大気下又は低酸素症状態のいずれにおいても、pHの低下とPaCO<sub>2</sub>の上昇が認められた (データは示さず)。

#### 【0035】

《表2》

	野生型マウス	タイタスビル変異マウス
pH		
通常大気下	7.42±0.01	7.42±0.03
低酸素症状態	7.45±0.03	7.46±0.03
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)		
通常大気下	44.0±0.9	41.9±4.4
低酸素症状態	39.6±6.6	37.5±5.6
PaO <sub>2</sub> (mmHg)		

通常大気下	85.7±4.2	84.8±6.8
低酸素症状態	56.2±9.0	58.7±11.0

## 【0036】

次に、タイタスビル変異マウス、プレズビテリアン変異マウス、及び野生型マウスにおける代謝パラメーターとして、O<sub>2</sub>消費量、CO<sub>2</sub>生成量、及び呼吸商を測定した。なお、前記測定は、Shirasawa, T. et al., J. Biol. Chem., 278, 5035-5043, 2003に記載の手順に従って行った。タイタスビル変異マウス及び野生型マウスについて、結果を表3に示す。表3に示すデータは、平均値±SEMであり、各記号「a」及び「b」は、タイタスビル変異マウスと野生型マウスとの間に有意差（a: p<0.05, b: p<0.01; unpaired Student's testによる）が認められることを示す。

両変異マウスとも、通常大気下又は低酸素症状態のいずれにおいても、野生型マウスと比べて、より多くのO<sub>2</sub>を消費し、より多くのCO<sub>2</sub>を生成した。

## 【0037】

《表3》

	野生型マウス	タイタスビル変異マウス
CO <sub>2</sub> 生成量(ml/min/kg)		
通常大気下	26.0±1.2	35.1±1.0 <sup>b</sup>
低酸素症状態	15.8±0.8	20.2±1.6 <sup>a</sup>
O <sub>2</sub> 消費量(ml/min/kg)		
通常大気下	34.7±2.0	42.2±2.2 <sup>a</sup>
低酸素症状態	24.7±1.2	29.8±2.3 <sup>a</sup>
呼吸商		
通常大気下	0.75±0.02	0.84±0.03 <sup>a</sup>
低酸素症状態	0.64±0.01	0.68±0.01

## 【0038】

(4) 筋肉の組織化学的分析及び酵素学的分析

タイタスビル変異マウス、プレズビテリアン変異マウス、及び野生型マウスの前脛骨筋の筋線維構成を検討するために、ATPアーゼ活性に基づく組織化学的染色を実施した。なお、前記染色は、Shirasawa, T. et al., J. Biol. Chem., 278, 5035-5043, 2003に記載の手順に従って行った。

タイタスビル変異マウス (Titu/Wt) 及び野生型マウス (Wt/Wt) について、前脛骨筋の深層部における組織化学的染色の結果を図4の上段に示し、前記染色に基づいて算出した筋線維構成を図5に示す。図4における各記号「IIA」及び「IIB」は、それぞれ、IIAタイプ繊維及びIIBタイプ繊維を意味し、下段左側 (Wt/Wt, SDH) の右下隅のスケールバーは、長さ50  $\mu$ mを示す。図5に示すデータは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=5) であり、図5に示す記号「\*」は、タイタスビル変異マウスと野生型マウスとの間に有意差 ( $p<0.001$ ; unpaired Student's testによる) が認められることを示す。

#### 【0039】

タイタスビル変異マウス及びプレズビテリアン変異マウスのいずれにおいても、前脛骨筋の深層部 (骨に近い側)、中層部、及び表層部 (筋肉の表面に近い側) での筋線維の肥大及び萎縮は観察されなかった (データは示さず)。しかし、図4に示すように、タイタスビル変異マウスでは、野生型マウスと比較して、IIAタイプ繊維の割合が高くなり、IIBタイプ繊維の割合が低下していた。また、プレズビテリアン変異マウスにおいても、同様の傾向が認められた。具体的には、IIAタイプ繊維及びIIBタイプ繊維の割合は、野生型マウスでは39.5%及び60.5%であるのに対して、タイタスビル変異マウスでは51.4%及び48.6%であり、プレズビテリアン変異マウスでは49.8%及び50.2%であった。なお、IIAタイプ繊維は、IIBタイプ繊維と比較して、酸化系酵素が豊富である。

#### 【0040】

次に、マウス前脛骨筋の酸化系酵素の指標であるサクシネートデヒドロゲナーゼ (SDH) 活性を測定した。SDH活性に基づく組織化学的染色は、Shirasawa, T. et al., J. Biol. Chem., 278, 5035-5043, 2003に記載の手順に従って行った。タイタスビル変異マウス及び野生型マウスについて、組織化学的染色の結果を図4の下段に示し、前記染色に基づいて算出したIIAタイプ繊維及びIIBタイプ繊維

におけるSDH活性の結果を図6に示す。図6に示すデータは、平均値±標準偏差 (n=5) であり、図6に示す記号「\*」は、タイタスビル変異マウスと野生型マウスとの間に有意差 ( $p<0.001$ ; unpaired Student's testによる) が認められることを示す。

タイタスビル変異マウスでは、野生型マウスと比較して、酸化系酵素活性が本来豊富であるIIAタイプ繊維においてSDH活性が増加しただけでなく、IIBタイプ繊維においてもSDH活性の増加が認められた。また、プレズビテリアン変異マウスにおいても、同様の傾向が認められた。タイタスビル変異マウス及びプレズビテリアン変異マウスにおけるこれらの前脛骨筋における変化は、末梢組織において高い酸素代謝能を獲得したことを示している。

#### 【0041】

##### (5) 自主的走行実験

タイタスビル変異マウス、プレズビテリアン変異マウス、及び野生型マウスにおける末梢組織への酸素運搬及び供給能力を検討する目的で、自主的走行実験を行い、一日当たりの平均走行距離を比較した。自主的走行実験は、飼育ケージ (20cm×30cm×12cm) 内にランニングホイール (幅=5cm、直径=25.5cm) を設置し、Shirasawa, T. et al., J. Biol. Chem., 278, 5035-5043, 2003に記載の手順に従って行った。

タイタスビル変異マウス (Titu/Wt) 及び野生型マウス (Wt/Wt) の結果を図7に示し、プレズビテリアン変異マウス (Pres/Wt) 及び野生型マウス (Wt/Wt) の結果を図8に示す。図7及び図8に示すデータは、平均値±標準偏差 (n=5) である。

#### 【0042】

タイタスビル変異マウスの一日当たりの平均走行距離は、野生型マウスと比較して、約2.5倍以上 (プレズビテリアン変異マウスでは、野生型マウスと比較して、約2倍以上) の値を示した。しかも、前記実施例2(1)に示したように、タイタスビル変異マウスでは、全ヘモグロビンに対するタイタスビル型ヘモグロビンの割合が、最大でも15%以下 (プレズビテリアン変異マウスでは30%以下) であり、タイタスビル型ヘモグロビンは含有割合が低いにもかかわらず、比較用の

プレズビテリアン型ヘモグロビンよりも、優れた酸素運搬及び供給能力を示すことが確認された。この結果は、タイタスビル型ヘモグロビンが、比較用のプレズビテリアン型ヘモグロビンと比較して、より優れた組織低酸素状態の改善効果を有することを示している。

#### 【0043】

##### 【発明の効果】

本発明の組織低酸素状態改善剤は、プレズビテリアン型ヘモグロビンよりも優れた効果を示すタイタスビル型ヘモグロビンを利用するため、組織低酸素状態の改善に関して優れた効果を示し、虚血病態の治療又は予防に有用である。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

タイタスビル変異マウスの作製方針を模式的に示す説明図である。

##### 【図2】

各変異マウス及び野生型マウスから調製した各赤血球の酸素解離曲線である。

##### 【図3】

各変異マウス及び野生型マウスから調製した各赤血球のHillプロットである。

##### 【図4】

タイタスビル変異マウス及び野生型マウスについて、ATPアーゼ活性又はSDH活性に基づく組織化学的染色の結果を示す、図面に代わる顕微鏡写真である。

##### 【図5】

タイタスビル変異マウス及び野生型マウスの前脛骨筋における筋線維構成を示すグラフである。

##### 【図6】

タイタスビル変異マウス及び野生型マウスにおける筋線維SDH活性を示すグラフである。

##### 【図7】

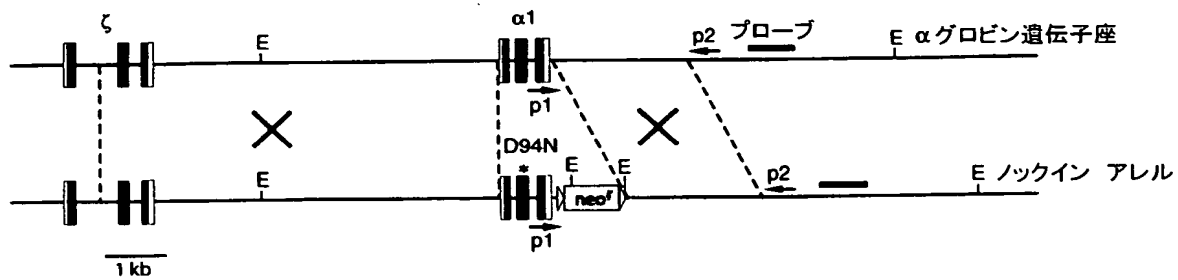
タイタスビル変異マウス及び野生型マウスにおける自主的走行実験の結果を示すグラフである。

##### 【図8】

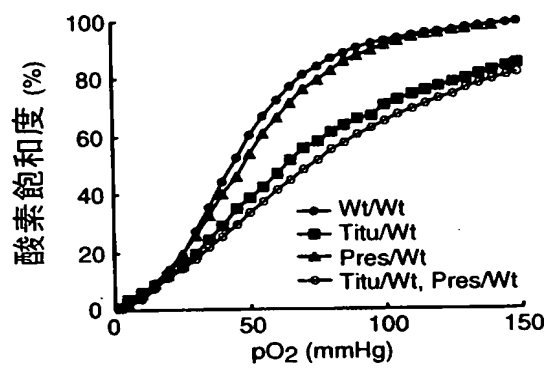
プレズビテリアン変異マウス及び野生型マウスにおける自主的走行実験の結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

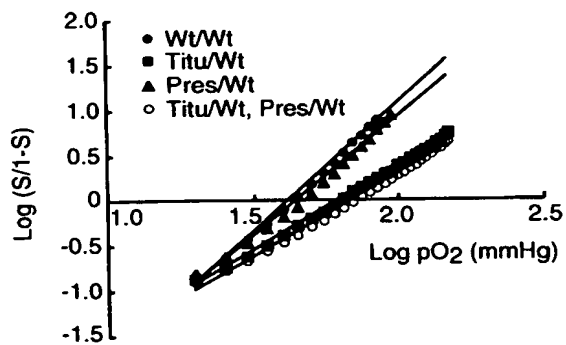
【図 1】



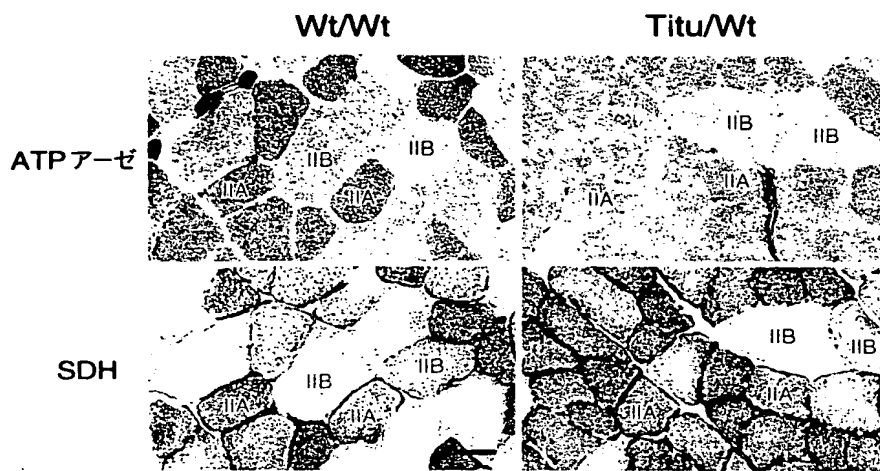
【図 2】



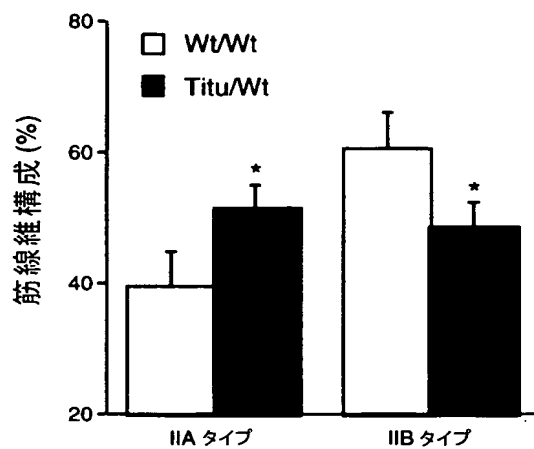
【図 3】



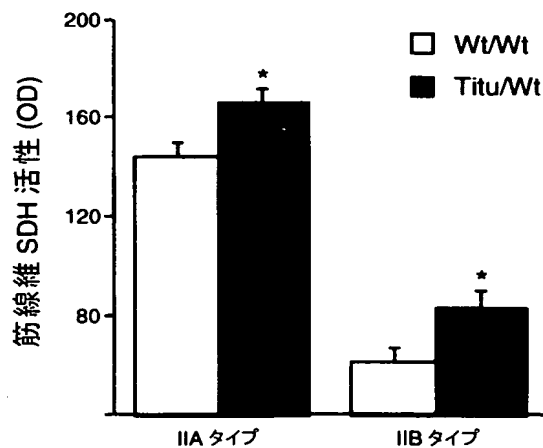
【図 4】



【図 5】

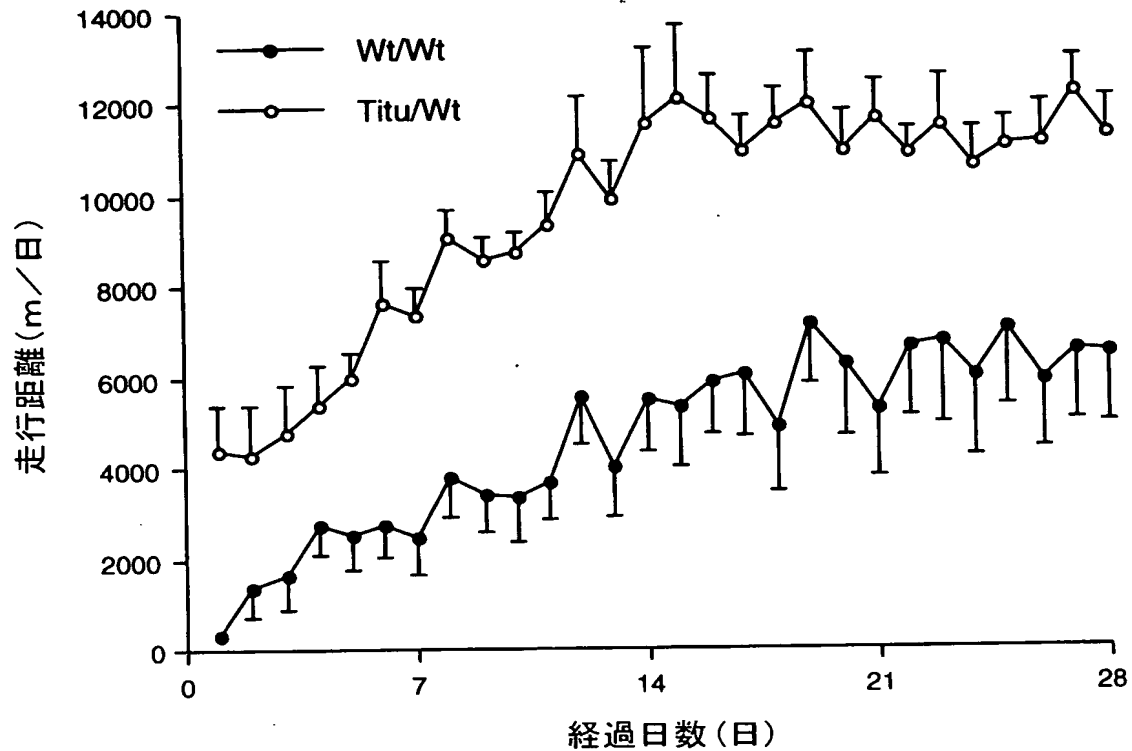


【図 6】

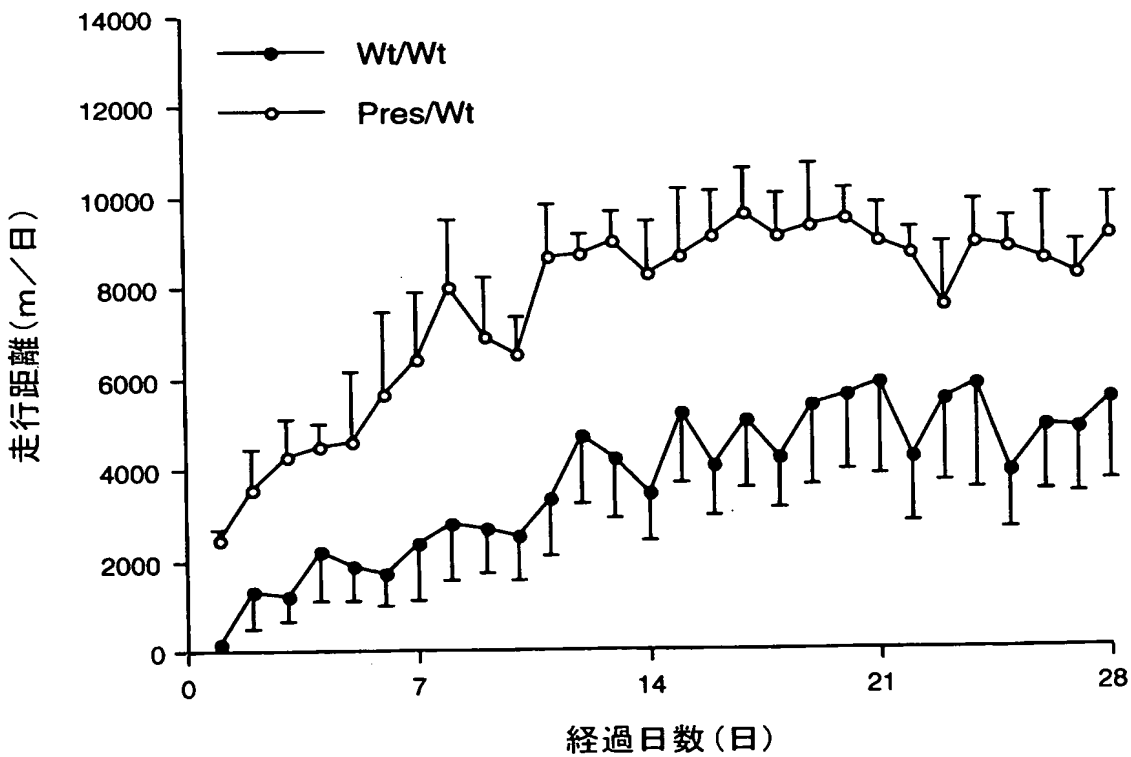




【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 虚血病態の治療又は予防に有用な、組織低酸素状態の改善剤を提供する。

【解決手段】 前記組織低酸素状態の改善剤は、(1) タイタスビル型変異を有する  $\alpha$  グロビン、(2) 前記タイタスビル型  $\alpha$  グロビンのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、又は(3) 前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、有効成分として含有する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-060057
受付番号	50300366465
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 6月20日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 3月 6日
-------	-------------

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 TMI03001P  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2003- 60057  
【承継人】  
    【住所又は居所】 東京都渋谷区広尾 1-11-2  
    【氏名又は名称】 株式会社フィナンシャル・コンサルティング  
【承継人代理人】  
    【識別番号】 100090251  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 森田 憲一  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 017813  
    【納付金額】 4,200円  
【プルーフの要否】 要

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-060057
受付番号	50300578336
書類名	出願人名義変更届
担当官	神田 美恵 7397
作成日	平成15年 8月 6日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成15年 4月 8日
【承継人】	
【識別番号】	503130518
【住所又は居所】	東京都渋谷区広尾1-11-2
【氏名又は名称】	株式会社フィナンシャル・コンサルティング
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100090251
【住所又は居所】	東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル5階
【氏名又は名称】	森田 憲一

特願2003-060057

出願人履歷情報

識別番号

[501115612]

1. 変更年月日

2001年 3月22日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都板橋区栄町35-2 財団法人 東京都老人総合研究所

分子遺伝学部門内

氏 名

白澤 卓二

特願2003-060057

出願人履歴情報

識別番号

[503088611]

1. 変更年月日

2003年 3月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都板橋区栄町35-2 東京都老人総合研究所内

氏 名

清水 孝彦

特願 2003-060057

出願人履歴情報

識別番号

[503130518]

1. 変更年月日

2003年 4月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都渋谷区広尾1-11-2

氏 名

株式会社フィナンシャル・コンサルティング



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**